

**FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE BESTIMMUNG
DES MENSCHLICHEN KERNGESCHLECHTES AN
LEICHENTEILEN UND BIOLOGISCHEN SPUREN**

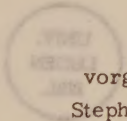
Stephan Musch

1975

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Spann

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE BESTIMMUNG
DES MENSCHLICHEN KERNGESCHLECHTES AN
LEICHENTEILEN UND BIOLOGISCHEN SPUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Stephan Musch
aus München

1975

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jungwirth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Spann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.7.1975



INHALT

Vorwort

Einleitung

Die Bedeutung der Kunst für die Menschheit

Die Kunst als Spiegel der Zeit

Die Kunst als Ausdruck der Seele

Die Kunst als Quelle der Inspiration

Die Kunst als Werkzeug der Erziehung

MEINER GROSSMUTTER

INHALT

	Seite
Einführung	1
Aufgabenstellung	11
Untersuchungsmaterial und Methode	12
Beobachtungen und Ergebnisse	14
Diskussion	24
Zusammenfassung	27
Literaturverzeichnis	28
Lebenslauf	

Einführung

Die Bestimmung des menschlichen Kerngeschlechtes kann an weiblichen Zellen durch Barr-Körperchen-Darstellung oder durch Darstellung des Y-Chromosoms an männlichen Zellen erfolgen. Bis vor wenigen Jahren konnte ein positiver Geschlechtsnachweis nur an weiblichen Zellen durchgeführt werden, nachdem dem Histologen M. L. BARR (3) durch Anfärbung des zweiten X-Chromosoms in weiblichen Zellkernen mit basischen Farbstoffen eine Differenzierung gegenüber männlichen Zellen gelang. Der positive Geschlechtsnachweis an männlichen Zellen ist erst seit den Untersuchungen von CASPERSSON und Mitarbeitern (6, 7, 8, 9, 10, 11) möglich, die gezeigt haben, daß sich Fluoreszenzfarbstoffe der Quinacringruppe in bestimmten Chromosomenabschnitten anreichern. Diese präferentielle Fluorochrom-Bindung könnte, so vermuteten CASPERSSON et al. (1968 u. 1969), auf zwei unterschiedlichen Mechanismen basieren. Entweder begünstigen besondere DNS-Strukturen eine räumliche Einlagerung dieser Farbstoffe oder es handelt sich um eine chemische Anlagerung der Fluorochrome an besonders guaninhaltige DNS-Abschnitte. Hierbei färbt sich das distale Segment am langen Arm des Y-Chromosoms besonders stark an. Auch im Interphasekern ist diese selektive Anfärbbarkeit des Y-Chromosoms möglich, so daß sich das Y-Chromosom als hell fluoreszierender Punkt-Fluoreszenzkörperchen oder F-body genannt - von den übrigen schwächer fluoreszierenden Kernbestandteilen abhebt (PEARSON, 1970).

Dieses Fluoreszenzkörperchen ist vor allem in Haarwurzelzellen und in Mundschleimhautepithelien häufig zweigeteilt, wobei die beiden fluoreszierenden Pünktchen immer relativ dicht, aber getrennt nebeneinander liegen (SCHWINGER, 1975). Häufig erscheint auch die Lage des Fluoreszenzkörperchen randständig. Nach SCHWINGER (30) erscheint es möglich, daß das Fluoreszenzkörperchen fast immer randständig lokalisiert ist und in den Fällen, in denen es im Zellkern zu liegen scheint, an der vorderen Zellmembran anhaftet.

Diese Möglichkeit einer Geschlechtsdiagnose wurde inzwischen angewendet bei Haarwurzelzellen (SCHWINGER, 1971a, 1971b, 1972b, 1975;

MÜLLER, 1972; TRÖGER u. LIEBHARDT, 1974), bei Blutzellen und Blutspuren (MAJEWSKI, 1971; SCHWINGER, 1972a, 1975; MENDE u. ALONSO, 1971; MÜLLER, 1971, 1972; BRINKMANN, 1973; SCHAIDT, 1973; TRÖGER u. LIEBHARDT, 1974), bei Mundepithelien (MAJEWSKI et al., 1971; ROBINSON, 1971; SCHNEDL, 1972, MÜLLER, 1972), bei Spermien (BARLOW, 1970; ROHDE, 1972; SCHWINGER, 1975), bei Amnionepithelzellen (MAJEWSKI et al., 1971; SCHWINGER, 1975), bei Zellen des Urinsediments (BACCICHETTI et al., 1971), bei Knorpelzellen (BERGHAUS et al., 1973; BRINKMANN, 1973), bei Zellen der Haut (HERBICH u. MEINHART, 1972; BRINKMANN, 1973) und bei Zellen verschiedener Organe wie Gehirn, Myokard, Leber, Milz, Muskulatur und Knochenmark (RADAM u. STRAUCH, 1971; HERBICH u. MEINHART, 1972; KOVAKS et al., 1972; BERGHAUS et al., 1973; IORIO u. WYANDT, 1973; SCHWINGER, 1975). Die Chromosomen-Fluorochromierung dient ferner zur Feststellung der Häufigkeit des YY-Syndroms (SCHWINGER, 1975), zur Kerngeschlechtsbestimmung bei unklarem Geschlecht (SCHWINGER, 1975), oder zur Geschlechtsbestimmung bei Spitzensportlerinnen. Zur Bestimmung des Kerngeschlechtes der an der XX. Olympiade in München 1972 teilnehmenden Sportlerinnen wurden Haarwurzelzellen von Kopfharen oder Augenbrauen verwendet.

In Abb. 1 erfolgt eine Zusammenstellung von Ergebnissen verschiedener Autoren hinsichtlich verwendeten Materials, Anfärbemethode, Alters der Präparate etc.. Dabei werden, soweit angegeben, die Anzahl der angefertigten Präparate, die Anzahl der untersuchten Zellen, der Mittelwert und die Spannweite der Fluoreszenzkörperchen-Frequenz aufgeführt.

In Abb. 2 soll die von einigen Autoren ermittelte zeitliche Nachweisgrenze der für eine sichere Geschlechtsdiagnose erforderlichen Fluoreszenzkörperchen-Frequenz in verschiedenem Zellmaterial angegeben werden.

Abb. 1 wurde in enger Anlehnung an BERGHAUS (4) erstellt.

Abb. 1

Verfasser	Jahr	Gewebe	Anfärbemethode	Probanden	Unters. Zellen	Mittelw. FB (%)	FB-Spannweiten(%)	Bemerkung
Herbich u. Meinhard (12)	1972	Haut-, Muskel-, Leber-, Nieren-, Gefäßendothelzellen	Quinacrin-dihydrochlorid	18 ♂ 8 ♀	keine Angaben	mind. 30 0	keine Angaben	Leichen mit einer Liegezeit von 3 - 7 Tagen
Kovacs (14)	1972	Gehirn	Quinacrin-dihydrochlorid	16 ♂ 10 ♀	je 100	44,0 0,5	39 - 49 0 - 2	1 3 1
		Myokard	"	16 ♂ 10 ♀	"	33,6 1,3	26 - 42 1 - 4	
		Leber	"	16 ♂ 10 ♀	"	30,6 1,3	18 - 43 1 - 5	
		Milz	"	16 ♂ 10 ♀	"	44,0 1,1	40 - 48 0 - 5	
		Knochenmark	"	16 ♂ 10 ♀	"	28,0 1,0	26 - 30 0 - 3	

Abb. 1 (Fortsetzung)

Verfasser	Jahr	Gewebe	Anfärbemethode	Probanden	Unters. Zellen	Mittelw. FB (%)	FB-Spannweiten (%)	Bemerkung
Majewski (15)	1971	Mundepithelien	Quinacrin-dihydrochlorid	11 ♂	2400	77,6	64 - 88,5	frische Präparate
				11 ♀	2600	5,75	1 - 20	einfache FB
		dto.	Acranil	11 ♂	2400	80,5	55 - 87	
				11 ♀	2600	3,7	0 - 14	
		Lymphocyten	Quinacrin-dihydrochlorid	10 ♂	1000	98,4		alle FB
				5 ♀	500	4,2		
Mende u. Alonso (16)	1971	Leukocyten	dto.	10 ♂	1000	97,3		
				5 ♀	500	2,6		
		Capillarblut	Quinacrin-dihydrochlorid					
		Granulocyten		25 ♂	je 100	84		frische Präparate
				25 ♀	je 100	6		
		Lymphocyten	dto.	25 ♂	je 50	68		
				25 ♀	je 50	8		

1
4
1

Abb. 1 (Fortsetzung)

Verfasser	Jahr	Gewebe	Anfärbemethode	Probanden	Unters. Zellen	Mittelw. FB (%)	FB-Spannweiten(%)	Bemerkung
Müller (17)	1971	Blutausstriche	Quinacrin-	120 ♂	keine		15 - 92	
		(Leucocyten)	dihydro-	40 ♀	Angaben		0 - 3	
		(mononukleäre Zellen)	chlorid					
		eingetr. Blut	dto.	20 ♂	versch.		0 - 43	verschiedene Unterlagen
				11 ♀			0 - 2	verschieden lange Lagerung
		im gewöhl.	dto.	20 ♂	keine		15 - 60	
		Blutausstrich		11 ♀	Angaben		0 - 2	
		der gleichen Person						
Müller (18)	1971	Mundschleimhaut	Quinacrin-dihydrochlorid	44 ♂ 20 ♀	je 100 je 100		20 - 60 6 - 8	frische Präparate einfache FB
		Haarscheide	dto.	120 ♂ 20 ♀	je 100 je 100		16 - 92 0 - 5	(einmal 9)
		Blut						
		(mononucl. Z.)	dto.	120 ♂ 20 ♀	je 100 je 100		15 - 92 0 - 1	

Abb. 1 (Fortsetzung)

Verfasser	Jahr	Gewebe	Anfärbemethode	Probanden	Unters. Zellen	Mittelw. FB (%)	FB-Spannweiten(%)	Bemerkung
Polani u. Mutton (20)	1971	Blutausstriche	Quinacrine	35 ♂		69	61 - 87	
		L=Lymphocyten	Mustard	10 ♂		37	27 - 60	
		P=Polymorphs	Hydrochlor.	28 ♂		57	20 - 88	
		O=Oral mucosa		50 ♂		78	61 - 92	
		F=Fibroblasts		30 ♀		5	0 - 13	
		L		18 ♀		7	1 - 22	
		P		27 ♀		8	0 - 25	
		O		4 ♀		3	1 - 7	
		F		12 ♂		44	0 - 71	
		L	Quinacrine-hydrochlorid in Wasser	12 ♂		35	14 - 50	
		P		11 ♀		2	0 - 7	
		L		11 ♀		4	0 - 10	
		P	dto. in Puffer	12 ♂		58	27 - 89	
Robinson (22)	1971	L		12 ♂		14	3 - 89	
		P		11 ♀		2	0 - 7	
				11 ♀		2	0 - 7	
		Mundschleimhautzellen	Quinacrinehydrochlorid	236 o		67,4	35 - 96	

Abb. 1 (Fortsetzung)

Verfasser	Jahr	Gewebe	Anfärbemethode	Probanden	Unters. Zellen	Mittelw. FB (%)	FB-Spannweiten(%)	Bemerkung
Schwinger (27)	1971	Haarwurzelzellen	Quinacrinhydrochlorid	52 ♂	je 100		15 - 64	frische
				40 ♀			äußerst selten	Präparate
Schwinger (28)	1971	Lymphocyten	Quinacrin-dihydrochlorid	5 ♂	Glasproben		20 - 30	
				5 ♀	je 50 Stoffpr. mind. 25		unter 5	
Träger Liebhardt (31)	1974	Blut	Quinacrine	125 ♂	mind. 30	60		
		Haarwurzelzellen	Mustard	67 ♂	mind. 25		60 - 70	

Abb. 1 (Fortsetzung)

Verfasser	Jahr	Gewebe	Anfärbemethode	Probanden	Unters. Zellen	Mittelw. FB (%)	FB-Spannweiten (%)	Bemerkung
Schwinger (30)	1975	Haarwurzelzellen	Quinacridindihydrochlorid	380 ♂	je 100	70,5	30 - 100	
				15 ♂	je 100		40 - 80	
		aus Leichen		7 ♀	je 100	1,71		
		Spermien	"	5 ♂	je 100		40 - 48	
		Aminoepithelzellen	"	8 ♂	je 100	63,0	48 - 73	
				10 ♀	je 100	0,2		
		Knorpelzellen	"	5 ♂	je 100		40 - 80	
		v. Leichen		5 ♀	je 100	unter 2,0		

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, ist bei fast allen zur Untersuchung herangezogenen Geweben durch Fluorochromierung der Zellen eine eindeutige Differenzierung hinsichtlich des Kerngeschlechtes möglich. Deshalb sollte zur Geschlechtsdiagnose eines vorliegenden Materials neben der BARR-Körperchen-Darstellung auch die Methode der Zellkern-Fluorochromierung herangezogen werden.

Die in Abb. 2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß in einigen Fällen noch nach Monaten eine Geschlechtszuordnung des untersuchten Materials möglich war. Die große Stabilität des Fluoreszenzkörperchens in abgestorbenen Zellkernen ist ein beachtenswerter Vorteil gegenüber der BARR-Körperchen-Darstellung, bei der die durch postmortale Zellveränderungen bewirkte Schollenbildung eine Geschlechtsdiagnose erschwert (SCHWINGER 1975). Nach SCHWINGER (30) ist in Zukunft zu fordern, daß die Festlegung des Kerngeschlechtes eines Individuums nur dann als gesichert gilt, wenn neben der BARR-Körperchen-Bestimmung auch die Zellfluorochromierung durchgeführt wird.

Abb. 2

Verfasser	Gewebe	zeitliche Nachweisgrenze
Brinkmann (5)	Blutspuren (Lagerung bei Raumtemperatur)	28 Monate
Kovacs (14)	Gehirn 30 % FB Myokard 26 % FB Leber 25 % FB Milz 25 % FB Knochenmark 15 % FB	23. Tag nach dem Tode und anschließender Leichenöffnung
Schaidt (24)	Blutproben (bei Zimmertemperatur gelagert) Blutproben (im Kühlschrank gelagert) Blutspur auf Leinen Blutspur auf Glas	17 Tage 63 Wochen 8 Wochen 6 Wochen
Schwinger (30)	Knorpelzellen Blutspuren alte Alkoholproben (Lagerung bei + 2 - + 4° C)	52 % FB nach 6 Monaten 6 Monate
Tröger (31)	Blutspuren Haarwurzelzellen	15 Monate 150 Tage

Aufgabenstellung

1. Bei Flugzeugabstürzen, schweren Busunglücken oder bei Zerstückelungen werden oft nur mehr einzelne Körper- oder Organteile aufgefunden. Eine Geschlechtsbestimmung an diesen Leichenteilen anhand der Barr-Körperchen-Bestimmung wird durch postmortale Schollenbildung in den Zellkernen, die auch in männlichen Zellkernen Barr-Körperchen imitiert, erschwert. Bei der Fluorochromierung der Chromosomen ist wegen der selektiven Anfärbung des Y-Chromosoms eine deutlichere und post mortem längere Identifizierung des Kerngeschlechtes gegeben (SCHWINGER, 1975).

Deshalb sollen in Zellen von Gehirn, Myokard, Leber, Lunge und Niere von Leichen unterschiedlicher Liegezeit die Fluoreszenzkörperchen-Frequenz und ihre zeitliche Veränderung nach Entnahme der Organe aus den Leichen untersucht werden.

2. Die fluoreszenzmikroskopische Geschlechtsbestimmung soll auch anhand von Organteilen, die über längere Zeit in 4 %igem Formalin fixiert waren, versucht werden.

3. Werden unter den Fingernägeln eines Notzucht- oder Mordopfers, das erst nach einigen Tagen oder Wochen aufgefunden wurde, abgekratzte Hautstückchen gefunden, wäre eine Geschlechtsdiagnose dieser Spur ein Hinweis zur Aufklärung eines solchen Verbrechens. Es soll daher die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzkörperchen-Frequenz in von Leichen stammenden Epidermiszellen in einem Zeitraum von 5 Monaten beobachtet werden.

4. Von Interesse in der forensischen Medizin dürfte auch die Provenienz von an Tatorten gefundenen Zigarettenskippen sein. Wenn etwa beim Rauchen von der Lippeninnenseite Zellen oder Zellverbände am Mundstück der Zigarette kleben bleiben, kann die Fluorochromierung dieser Zellen das Geschlecht des Rauchers einer Zigarette erkennen lassen.

Untersuchungsmaterial und Methode

Aus Leichen unterschiedlicher Lagerungszeit werden Teile von Gehirn, Myokard, Leber, Lunge und Niere entnommen. Diese Organteile werden bis zur Untersuchung in einem kleinen Behälter unter Luftabschluß gelagert, bei der dann die Gewebeproben auf einem fettfreien Objektträger ausgestrichen werden.

Die über längere Zeit in 4 %igem Formalin fixierten Organteilen werden ebenfalls auf einem fettfreien Objektträger ausgestrichen.

Bei Hautpräparaten wird zuerst die oberste Schicht mit einem Skalpell abgekratzt, dann werden mit einem Metallspatel weitere Zellschichten abgeschabt. Diese werden auf einen fettfreien Objektträger aufgebracht, mit physiologischer Kochsalzlösung überschichtet, nach 10 Minuten mit einem zweiten Objektträger nivelliert und gelangen somit auf zwei Objektträgern zur weiteren Untersuchung.

Die Zigarettkippen werden mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet. Dann wird mit dem Ende der Kippe und mit einem zuvor herausgeschnittenen Filterpapierstreifen mit geringem Druck über einen Objektträger gefahren. Bei filterlosen Zigarettkippen wird vom Mundstück ein etwa 5 - 8 mm breites, ringförmiges Stück abgetrennt, mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet und unter geringer gleitender Reibung auf dem Objektträger abgerollt. Zur Vermeidung von Fehlermöglichkeiten werden die Kippen mit einer Pinzette gefaßt.

Nach Trocknung werden die Objektträger mit 25 %iger Essigsäure überschichtet, 3 - 5 Minuten fixiert und nach Abgießen der Essigsäure luftgetrocknet. Die Fluorochromierung der Präparate erfolgt 15 - 20 Minuten, bei älterem Zellmaterial von Zigarettkippen bis zu 30 Minuten in einer 0,5 %igen Lösung von Quinacrin Mustard in Mc Ilvain-Puffer. Nach anschließender 5minütiger Differenzierung in stehendem Leitungswasser wird entweder in Phosphatpuffer (pH 7,0) oder in Mc Ilvain-Puffer (pH 5,5) eingebettet.

Die Auswertung erfolgt mit einem LEITZ-WETZLAR Auflichtfluoreszenzmikroskop "ORTHOLUX II" mit einer Quecksilber-Höchstdruck-

lampe HBO 50 W und den Filtern BG 38 blau und KH 510. Die Präparate werden unter fluoreszenzfreier Ölimmersion ($n_D = 1,515$; $v = 49$) bei 220- und 1.000facher Vergrößerung ausgewertet.

Beobachtungen und Ergebnisse

Eigene Untersuchungen stimmen mit der Beobachtung von SCHWINGER (29) überein, daß bei Wangenschleimhautabstrichen fast immer auch pyknotische Zellkerne der obersten Epithelschicht erhalten werden, in denen nur mehr vereinzelt Fluoreszenzkörperchen zu beobachten sind. Bei diesem Zellmaterial kann deshalb keine exakte Angabe der Fluoreszenzkörperchen-positiven Zellen gestellt werden. Dennoch sollen in Abb. 3 die abgerundeten Mittelwerte der Fluoreszenzkörperchen-Frequenz von jeweils 10 Wangenschleimhautabstrichen bei verschieden langer Fixierung in 25 %iger Essigsäure aufgeführt werden, um zu sehen, ob zu kurze oder zu lange Fixation die Frequenz der F-body-positiven Zellen verändert.

F-body-positive Zellen
in %

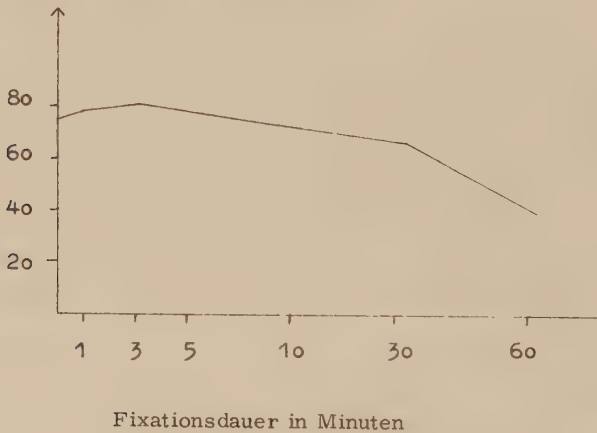


Abb. 3: F-body-positive Zellen in % von je 100 beurteilten männlichen Zellen in Abhängigkeit von der Fixationsdauer.

Aus Abb. 3 ist zu ersehen, daß bei Zellmaterial von Wangenschleimhaut die optimale Fixationsdauer bei etwa 2 - 5 Minuten liegt. Bei Ver-

nicht auf eine Fixierung wird die selektive Anfärbung des Y-Chromosoms nicht wesentlich beeinträchtigt.

Fehlermöglichkeiten

Durch abnorme Fluoreszenz von autosomalem Chromatin kann es manchmal in weiblichen und auch in männlichen Zellkernen zur Bildung von unspezifischen Fluoreszenzkörperchen kommen, deren seltenes Auftreten aber bei eindeutigen Ergebnissen eine Diagnose nicht beeinträchtigt. Bakterien oder Verunreinigungen, die sich manchmal über Zellkerne projizieren, können dagegen unschwer von F-bodies unterschieden werden.

Ergebnisse zu Punkt 1 der Aufgabenstellung

1.1

Die Fluoreszenzkörperchen-Frequenz von Gehirn, Myokard, Leber, Lunge und Niere von Leichen mit einer Liegezeit von 1 - 4 Tagen an verschiedenen Tagen nach Entnahme der Organe aus den Leichen wird in Abb. 4, von Leichen mit einer Liegezeit von 5 - 8 Tagen in Abb. 5 aufgeführt. Bei der Auswertung der Präparate wurden neben den Organzellen auch die in den Organen enthaltenen Blutzellen mitbewertet, da ja auch diese die Geschlechtsbestimmung eines aufgefundenen Organteiles ermöglichen.

Untersuchungen an Organen von 7 weiblichen Leichen unterschiedlicher Liegezeit an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen ergaben eine Fluoreszenzkörperchen-Frequenz von 0 - 11 % bei je 100 ausgezählten Zellen.

Tage nach Ent- nahme der Organe	Gehirn	Myokard	Leber	Lunge	Niere
1	83, 79, 80, 74	71, 52, 33, 73	64, 59, 72, 81	87, 70, 54, 91	82, 84, 91, 93
2	74, 82, 72, 30	51, 46, 44, 54	57, 37, 61, 59	87, 72, 45, 70	69, 73, 60, 69
3	51, 62, 61, 15	28, 21, 5, 14	32, 22, 33, 11	68, 61, 22, 35	54, 41, 71, 50
5	6, 10, 21, --	--, --, --, --	--, 5, --, 6	--, --, --, --	--, 6, --, --
10	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --

Abb. 4: Fluoreszenzkörperchenfrequenz in Organen von männlichen Leichen mit einer Liegezeit von 1 - 4 Tagen in % bei 100 ausgezählten Zellen.

Tage nach Ent- nahme der Organe	Gehirn	Myokard	Leber	Lunge	Niere
1	80, 86, 52, 84	45, 55, 23, 50	16, 17, 38, 58	10, 61, 64, 62	61, 70, 32, 51
2	72, 79, 52, 68	29, 47, --, 32	19, 22, --, 43	--, 40, 23, 18	51, 50, 31, 30
3	31, 23, 28, 9	--, 13, --, --	--, 4, --, 12	--, 38, --, --	18, 31, 3, --
4	2, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, -4	--, --, --, --	13, --, --, --
6	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --
10	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --	--, --, --, --

Abb. 5: Fluoreszenzkörperchenfrequenz in Organen von männlichen Leichen mit einer Liegezeit von 5 - 8 Tagen in % bei 100 ausgezählten Zellen.

1.2

Die Organe von 3 männlichen und 2 weiblichen, in starke Fäulnis übergegangenen Leichen, die zwischen 6 und 13 Tagen in geheizten Räumen gelegen hatten, wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen untersucht. F-body-positive Zellen konnten in keinem Präparat beobachtet werden.

1.3

Ferner wurden Gehirn, Herz und Leber von zwei männlichen, an der Haut und den oberflächlichen Weichteilschichten verkohlten Leichen untersucht. Die Resultate sind in Abb. 6 aufgeführt.

Tage nach Entnahme der Organe	Gehirn	Herz	Leber
1	39, 28	11, 20	30, 41
2	18, --	--, --	--, 13
3	--, --	--, --	--, --

Abb. 6: F-body-positive Zellen in Gehirn, Herz und Leber einer an der Oberfläche verkohlten, männlichen Leiche in % bei 100 ausgezählten Zellen.

Bei einer verkohlten weiblichen Leiche waren keine F-body-positiven Zellen zu beobachten.

Ergebnisse zu Punkt 2 der Aufgabenstellung

Von 7 weiblichen und 8 männlichen Leichen wurden Gehirn, Herz und Leber, die über längere Zeit in 4 %igem Formalin fixiert waren, untersucht. Schollenbildung in den Zellkernen verhinderte eine Diagnose des Kerngeschlechtes; F-body-positive Zellen konnten nur extrem selten beobachtet werden. Diese Schollenbildung wurde auch in Zellen von Mundschleimhaut, die nur wenige Minuten 4 %igem Formalin ausgesetzt waren, beobachtet.

Ergebnisse zu Punkt 3 der Aufgabenstellung

Epidermiszellpräparate, nach der oben beschriebenen Methode ohne Isolierung der Zellkerne angefertigt, sind im Verband wegen der Überlagerung mehrerer Zellschichten nur schwer zu beurteilen. Bei sorgfältiger Durchmusterung der Präparate können aber noch genügend beurteilbare Zellen gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 angegeben. 20 Hautpräparate von weiblichen Leichen, ebenfalls in einem Zeitraum von 12 Tagen untersucht, zeigten eine F-body-Frequenz von 0 - 7 %.

4 Hautpräparate (2 männliche - 2 weibliche) wurden über einen längeren Zeitraum hinweg untersucht. Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzkörperchen-Frequenz ist in Abb. 8 aufgeführt.

Ergebnisse zu Punkt 4 der Aufgabenstellung

In den nach der beschriebenen Methode angefertigten Präparaten sieht man, daß fast immer beim Rauchen sowohl von Filterzigaretten als auch von filterlosen Zigaretten unverhorntes Plattenepithel der Lippeninnenseite in Form von einzelnen Zellen oder auch ganzen Zellverbänden an den Zigarettenkippen kleben bleibt. Somit ist eine Möglichkeit gegeben, das Geschlecht des Rauchers zu bestimmen. Allerdings findet man bei der Auswertung der Präparate oft pyknotische Zellkerne der obersten Epithellagen, die eine exakte Angabe der Fluoreszenzkörperchen-Frequenz verhindern. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 aufgeführt.

Tage nach Entnahme der
Haut aus der Leiche

1	F+++ , F++ , F++ , F++
2	F++ , F+ , (F) +
3	F++ , (F) ++
4	F++ , F++ , F+
5	F++ , F+ , (F) ++
7	F++ , F++ , (F) +
8	F++
9	F++ , F+
12	F++ , F+ , F+

Abb. 7: Fluoreszenzkörperchen-positive Zellen in Epidermiszell-
präparaten von Leichen an verschiedenen Tagen nach Ent-
nahme der Haut aus der Leiche.

F - = 0 - 10 % FB; > 40 Zellen bewertet

F (+) = 10 - 20 % FB; > 40 Zellen bewertet

F + = 20 - 40 % FB; > 40 Zellen bewertet

F ++ = 40 - 60 % FB; > 40 Zellen bewertet

F +++ = > 60 % FB; > 40 Zellen bewertet

(F) - = 0 - 10 % FB; < 40 Zellen bewertet

(F) (+) = 10 - 20 % FB; < 40 Zellen bewertet

(F) + = 20 - 40 % FB; < 40 Zellen bewertet

(F) ++ = 40 - 60 % FB; < 40 Zellen bewertet

(F) +++ = > 60 % FB; < 40 Zellen bewertet

Tage nach Entnahme der Haut aus der Leiche	Haut o	Haut o	Haut ♀	Haut ♀
1	F+++	F+++		F-
2			F-	
6	F++		F-	
8		F++		F-
13	F++		F-	
14		F++		F-
19		F++		
22	F++		F-	
27	F+++		F-	
37	F++			
43	F+			
48	F+			
54		F+		F-
59	F+			
83	F(+)			
103		F(+)		F-
119		F+		F-
132	F(+)			
148	F(+)			

Abb. 8: Fluoreszenzkörperchen-positive Zellen in Epidermiszellpräparaten von Leichen an verschiedenen Tagen nach Entnahme der Haut aus der Leiche. Siehe auch Legende Abb. 7.

Tage nach dem Rauchen der Z.	F = Filterzigaretten f = Zigaretten ohne Filter
0	F+++ , F+++ , F+++ , f+++ , f++
1	F++ , F++ , F+++ , F+++ , F+++ , F+
2	F+++ , F+++ , F++ , F++
3	F++ , F++ , f++ , f++ , f+
4	F++ , F+ , f++ , (f)+
6	F++ , F++
7	F++ , F+
10	F++ , F+ , f+ , f+
12	F++ , F+ , F+
13	F++ , F++ , F++
14	F+ , F+ , F+ , F (+)
15	F+ , (F) (+)
16	F++
17	F++ , F+ , F+
18	F++ , F++ , F++ , F (+)
20	F++ , F (+)
21	f+ , f+ , (f) (+)
22	F+ , F (+)
24	F+ , F (+) , F (+)
25	(f) (+) , F-
26	F+ , (F) (+) , F- , F-
28	F (+) , (F) (+) , (f)- , f-
31	F (+) , F-
33	(f)- , (f)-
36	(F) (+) , F-
40	(F) (+) , F (+)
45	F- , F- , (f)- , (f)-
49	F (+)

Abb. 9: F-body-positive Zellen von Zigarettenkippen männlicher Provenienz. Siehe auch Legende Abb. 7.

Die F-body-Frequenz von 49 Zigarettenkippen weiblicher Provenienz, die bis zu 45 Tage nach dem Rauchen untersucht wurden, wies eine Streuung von 0 - 9 % auf.

Diskussion

Diskussion zu Punkt 1 der Aufgabenstellung

Die unter 1.1 aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß ein Nachweis von Fluoreszenzkörperchen-positiven Zellen und damit eine Geschlechtsbestimmung an den Organen Gehirn, Herz, Leber, Lunge und Niere aus Leichen mit einer Liegezeit von 1 - 8 Tagen in einem Leichen-Kühlraum bei + 4° C möglich ist. Die zeitliche Grenze für diesen Nachweis wird aber vom Zustand der Leiche abhängig sein, wie die unter 1.2 aufgeführten Resultate zeigen. Als entscheidende Parameter sind hierbei Temperatur und Feuchtigkeit am Lagerungsort der Leiche anzusehen. Die Lagerung in einem Leichen-Kühlraum oder in einem ungeheizten Zimmer zu kalter Jahreszeit wird einen anderen Fäulnisgrad erwarten lassen als die Lagerung in einem gut geheizten, nicht gelüfteten Raum. Ferner ist aus der schnellen Abnahme der F-body-positiven Zellen zu ersehen, daß die Organe in den ersten zwei Tagen nach Entnahme aus der Leiche untersucht werden müssen, denn an isolierten, bei einer Temperatur von + 20° C gelagerten Organteilen ist eine Zuordnung nach 3 - 4 Tagen nicht mehr möglich. Von den untersuchten Organen weist das Gehirn die höchste F-body-Frequenz auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis einer Untersuchung von M.KOVACS (14).

Diskussion zu Punkt 2 der Aufgabenstellung

Ein Geschlechtsnachweis an über längere Zeit in 4 %igem Formalin fixierten Organteilen kann nicht durchgeführt werden. Ferner ist bei Mundschleimhautpräparaten, die nur für wenige Minuten mit 4 %igem Formalin überschichtet wurden, ein rapides Absinken der F-body-Frequenz zu beobachten.

Diskussion zu Punkt 3 der Aufgabenstellung

Wie schon in den Untersuchungen von B. BRINKMANN und von J. HERBICH und K. MEINHART dargelegt wurde, ist eine Geschlechtsdiagnose durch Zellfluorochromierung auch an Epidermiszellen möglich. Die oben angeführten Ergebnisse bestätigen dies. Darüber hinaus ersieht man aus ihnen, daß manchmal noch nach Monaten eine Zuordnung der Hautspuren erreichbar ist, vorausgesetzt, daß genügend Zellmaterial bewertet werden kann. Wenn dagegen nur wenige Zellen bewertet werden können ((F)+), oder bei genügend beurteilbaren Zellkernen nur 10 - 20 % Fluoreszenzkörperchen-positive Zellen gefunden werden, kann eine Geschlechtsdiagnose nur bedingt gestellt werden.

Bei eindeutigem Befund kann somit die Fluorochromierung von Epidermiszellen, die unter den Fingernägeln eines Mord- oder Notzuchtopfers, an einer Stichwaffe oder an einem, an einem Verkehrsunfall beteiligten Kraftfahrzeug gefunden werden, einen Hinweis zur Aufklärung eines Deliktes geben. Bei negativem Befund an älteren Hautspuren dagegen kann eine Geschlechtsdiagnose nicht gestellt werden.

Diskussion zu Punkt 4 der Aufgabenstellung

Der eindeutige Nachweis von Fluoreszenzkörperchen-positiven Zellen an Zigarettenkippen, die am Tatort eines aktuellen Mordfalles in München aufgefunden wurden, gab den Anstoß zu weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet. Diese Zellen stammen vom Epithel der Lippeninnenseite und bleiben beim Rauchen von Filterzigaretten und Zigaretten ohne Filter am Mundstück kleben. Die Zellausbeute und der Prozentsatz von F-body-positiven Zellen sind von mehreren Faktoren abhängig. Gesprungene Lippen, Benützung eines Lippenstiftes, die Stellung der Lippen beim Rauchen, die Beschaffenheit des Filterstückes bzw. des Mundstückes filterloser Zigaretten werden die Fluoreszenzkörperchen-Frequenz und vor allem die Anzahl der auf den Objektträger übertragbaren Zellen und somit die Sicherheit der Geschlechtsdiagnose entscheidend mitbestimmen. Daher kann man bei diesem Zellmaterial auch keine genaue Nachweisgrenze festsetzen. Aus den aufgeführten Resultaten ist aber zu ersehen, daß in den ersten 20 Tagen

nach dem Rauchen einer Zigarette eine Diagnose fast immer möglich ist, eine Zuordnung bei 4 - 5 Wochen alten Kippen nur mehr mit Vorbehalt durchgeführt werden kann. Dies ist dann der Fall, wenn weniger als 40 Zellen bewertet werden können oder wenn die F-body-Frequenz nur 10 - 20 % der ausgezählten Zellen beträgt. Theoretisch muß ferner die Möglichkeit eines falsch positiven oder falsch negativen Ergebnisses in Erwägung gezogen werden, da ja manchmal beim "Laß mich mal ziehen" eine Zigarette von zwei Personen geraucht wird.

Bei der Untersuchung von filterlosen Zigaretten wurde eine durchschnittlich geringere Zellausbeute beobachtet, was wahrscheinlich mit der Stellung der Lippen beim Rauchen von filterlosen Zigaretten zu erklären ist.

Zusammenfassung

Eine Diagnose des menschlichen Kerngeschlechtes durch Fluorochromierung der Zellkerne mit Quinacrine Mustard war an Zellmaterial von Gehirn, Myokard, Leber, Lunge und Niere möglich, das Leichen mit einer Liegezeit von 1 - 8 Tagen bei + 4⁰ C entnommen wurde. Nach Entnahme der Organe aus den Leichen konnte nur in den ersten zwei Tagen eine F-body-Frequenz von über 30 % von 100 ausgewerteten, männlichen Zellen festgestellt und damit eine Geschlechtsdiagnose abgegeben werden.

An Organen, die aus Leichen mit Zeichen deutlicher Leichenfäulnis entnommen wurden, war eine Zuordnung nicht möglich. Gehirn, Herz und Leber von zwei männlichen, an der Haut und den oberflächlichen Weichteilschichten verkohlten Leichen wiesen eine im Vergleich zu Organen von anderen Leichen deutlich geringere Fluoreszenzkörperchen-Frequenz auf.

An über längere Zeit in 4 %igem Formalin fixierten Organteilen konnte eine Geschlechtsbestimmung durch Zellfluorochromierung nicht durchgeführt werden.

Eine Geschlechtsdiagnose von frischen Epidermiszellpräparaten war immer möglich, eine Diagnose bei älteren, bis zu mehrere Monate gelagerten Hautspuren konnte oft nur mit Vorbehalt abgegeben werden.

Ein weiterer Anwendungsbereich dieser Methode in der forensischen Medizin wurde anhand von Zellmaterial von Zigarettenskippen untersucht. Sowohl bei Filterzigaretten als auch bei filterlosen Zigaretten bleiben beim Rauchen einzelne Zellen oder auch ganze Zellverbände unverhornten Plattenepithels am Mundstück der Zigarette kleben. Die Fluorochromierung dieser Zellen ließ eine Geschlechtsbestimmung des Rauchers von bis zu 3 Wochen alten Zigarettenskippen zu.

Literaturverzeichnis

- (1) BACCICHETTI, C.,
Tenconi, R.,
Largaiolli, G.: Screening test for Y-Chromosome in
newborn using urinary epithelial cells.
Lancet (1971) II, 1328
- (2) BARLOW, P.: The Y-Chromosome in human sperma-
tozoa.
Nature (London) Vol. 226, 961 (1970)
- (3) BARR, M.L.,
BERTRAM, E.G.: Amorphological distinction between
neurons of male and female and the
behavior of the nucleolar satellite
during accelerated nucleoprotein syn-
thesis.
Nature (London) 163, 676 (1949)
- (4) BERGHAUS, G.,
REIFENBERG, U.,
DOTZAUER, G.: Geschlechtsbestimmung an Skelett-
teilen.
Z. Rechtsmedizin 72, 255 - 268 (1973)
- (5) BRINKMANN, B.,
JOBST, U.: Bestimmung des Kerngeschlechtes an
biologischen Spuren.
Z. Rechtsmedizin 73, 1 (1973)
- (6) CASPERSSON, T.,
FARBER, S., FOLEY,
G.E., KUDYNOWSKI, I.,
MODEST, E.J.,
SIMONSSON, E.,
WAGH, U., ZECH, L.: Chemical differentiation along meta-
phase chromosomes.
Exp. Cell Res. 49, 219 - 222 (1968)
- (7) CASPERSSON, T.,
ZECH, L., MODEST,
E.J., FOLEY, G.E.,
WAGH, U., SIMONS-
SON, E.: Chemical differentiation with fluores-
cent alkylating agents in Vicia Faba
metaphase chromosomes.
Exp. Cell res 58, 128 (1969)

- (8) -----: DNA-binding fluorochromes for the study of the organization of the metaphase nucleus.
Exp. Cell Res. 58, 141 (1969)
- (9) ----- JOHANSSON, C.: Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes.
Exp. Cell Res. 60, 315 (1970)
- (10) ----- LINDSTEIN, J.,
HULTEN, M.: Fluorescent staining of heteropyknotic chromosome regions in human interphase nuclei.
Exp. Cell Res. 61, 472 (1970)
- (11) -----: Quinacrine mustard fluorescence of human chromosomes 4, 5, and X.
Exp. Cell Res. 61, 474 (1970)
- (12) HERBICH, J.,
MEINHART, K.: Fluoreszenzoptischer Nachweis des Y-Chromosoms in isolierten Gewebszellkernen.
Ärztl. Lab. 18, 328 - 331 (1972)
- (13) IORIO, R.J.,
WYANDT, H.E.: Quinacrine Studies of Sex Chromatin and Nucleoli in Human Brain.
Z. Rechtsmedizin (1973) 329 - 333
- (14) KOVACS, M.,
HARSANYI, L.,
SELLYEI, M.: Y-body in cell nuclei of parenchymatous organs.
Z. Rechtsmedizin 71, 104 - 107 (1972)
- (15) MAJEWSKI, F.,
BIER, L., PFEIFFER, R.A.: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis des menschlichen Y-Chromosoms in Interphasekernen durch Acridinderivate (Atebrin, Acranil)
Klin. Wschr. 49, 814 (1971)
- (16) MENDE, S.,
ALONSO, A.: Bestimmung des männlichen Kerngeschlechtes in menschlichen Blutzellen.
Dtsch. med. Wschr. 26, 1122 (1971)

- (17) MÜLLER, H., BÜHLER, E.M., VOEGELIN, M.G., STALDER, G.R.: Eine neue Methode der Geschlechtsbestimmung in Leukocyten aus eingetrockneten Blutflecken.
Schweiz. med. Wschr. 101, 1171 (1971)
- (18) MÜLLER, H., VOEGELIN, M.G., BÜHLER, E.M., STALDER, G.R.: Erfahrungen mit der fluoreszenzmikroskopischen Erfassung des menschlichen Y-Chromosoms in Interphasekernen verschiedener Gewebe.
Archiv f. Genetik 45, 35 (1972)
- (19) PEARSON, P.L., BOBROW, M., VOSA, C.G.: Technique for identifying y-chromosomes in human interphase nuclei.
Nature (London) 226 (1970)
- (20) POLANI, P.E., MUTTON, D.E.: Y-fluorescence of interphase nuclei, especially circulating lymphocytes.
Brit. med. J. 1971 I 138
- (21) RADAM, G., STRAUCH, G.H.: Lumineszenzmikroskopischer Nachweis des Y-Chromosoms in Knochenmarkszellen - Eine neue Methode zur Geschlechtserkennung an Leichenmaterial.
Krim. u. forens. Wiss. 6, 149 (1971)
- (22) ROBINSON, J.: Y chromosome fluorescence in buccal mucosa cells: a study on a newborn population.
Ann. Hum. Genet. (Lond.) 61 - 65 (1971), 35
- (23) ROHDE, W., PORSTMANN, T., ZILLMANN, R., DÖRNER, G.: Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Y-Chromosoms in unbehandelten und trypsinbehandelten menschlichen Spermien.
Acta biol. med. germ. 28, 189 (1972)

- (24) SCHAIDT, G.,
KRÜGER, A.: Die Geschlechtsbestimmung an Blut-
proben und Blutspuren männlicher Per-
sonen.
Arch. f. Kriminol. 151, 41 - 48 (1973)
- (25) SCHNEDL, W.: Die Atebrin-Fluoreszenzmethode in der
Human-Zytogenetik.
Wien. klin. Wschr. 84, 389 (1972)
- (26) SCHWINGER, E.: Neue Methoden zur Geschlechtsbe-
stimmung.
Krimin. u. forens. Wiss. 6, 145 (1971a)
- (27) SCHWINGER, E.,
RAKEBRAND, E.,
MÜLLER, H.J.,
BÜHLER, E.M.,
TETTENBORN, U.: Y-body in hair roots.
Humangenetik 12, 79 (1971b)
- (28) SCHWINGER, E.: Geschlechtsbestimmung aus Blutspuren.
Z. Rechtsmedizin 70, 157 (1972a)
- (29) SCHWINGER, E.,
PERA, F.: On the splitting of the Y fluorescent body
in man.
Humangenetik 14, 107 (1972b)
- (30) SCHWINGER, E.: Bedeutung und gerichtsmedizinische An-
wendung der DNS-Fluorochromierung
von Chromosomen und Zellkernen.
Bei Schmidt-Römhild Lübeck, Band 13
(1975)
- (31) TRÖGER, H.D.,
LIEBHARDT, E.: Zur zeitlichen Nachweisgrenze des
Y-Chromosoms an Blutspuren und Haa-
ren.
Beitr. z. Gerichtl. Med. Band XXXII
(1974)

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Spann, Herrn Professor Dr. Jungwirth und Herrn Dr. Hans Dieter Tröger für die Überlassung des Themas, Herrn Dr. H.D. Tröger für seine fachlichen Ratschläge und Fräulein Schmidt für ihre stets freundliche Hilfe im cytologischen Labor.

Lebenslauf

Am 19. Mai 1949 wurde ich in Basel/Schweiz als Sohn der Arzthitwe Elisabeth Musch geboren. Kurz nach meiner Geburt verstarb meine Mutter an Leukämie. Von 1955 an besuchte ich 4 Jahre die Volksschule und daran anschließend 9 Jahre lang das St. -Michaels-Gymnasium der Benediktiner METTEN, wo ich 1968 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Nach 5 Semestern bestand ich im Frühjahr 1971 das Physikum, im Herbst 1974 beendete ich, ebenfalls in München, mit dem Staatsexamen das Studium der Humanmedizin. Seit Frühjahr 1975 bin ich als Medizinalassistent an der III. Medizinischen Abteilung des Schwabinger-Krankenhauses bei Professor Dr. Mehnert tätig.

